



植物遗传资源学报

Journal of Plant Genetic Resources

ISSN 1672-1810, CN 11-4996/S

## 《植物遗传资源学报》网络首发论文

题目: 苦荞基因 FtAPDSLX1 的克隆及其抗立枯病功能分析  
作者: 杨智敏, 彭晓杨, 黄旭, 焦茹玉, 李伟, 关超男, 周美亮, 严明理, 肖璐  
DOI: 10.13430/j.cnki.jpgr.20240410001  
收稿日期: 2024-04-10  
网络首发日期: 2024-11-11  
引用格式: 杨智敏, 彭晓杨, 黄旭, 焦茹玉, 李伟, 关超男, 周美亮, 严明理, 肖璐. 苦荞基因 FtAPDSLX1 的克隆及其抗立枯病功能分析[J/OL]. 植物遗传资源学报. <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240410001>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

# 苦荞基因 *FtAPDSLX1* 的克隆及其抗立枯病功能分析

杨智敏<sup>1,2</sup>, 彭晓杨<sup>1,2</sup>, 黄旭<sup>2</sup>, 焦茹玉<sup>1</sup>, 李伟<sup>2</sup>, 关超男<sup>2,3</sup>, 周美亮<sup>2</sup>, 严明理<sup>1</sup>, 肖璐<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 湖南科技大学生命科学与健康学院, 湘潭 411201; <sup>2</sup> 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; <sup>3</sup> 海南省种业实验室, 海南 572025)

**摘要:** 苦荞 (*Fagopyrum tataricum*) 是蓼科 (Polygonaceae) 荞麦属 (*Fagopyrum*) 的一年生草本植物, 是一种药食同源的优质作物。荞麦立枯病的发生严重影响了苦荞种植的推广与发展。本研究对茉莉酸或水杨酸处理后的苦荞进行转录组分析, 发现天冬氨酸蛋白酶基因 *FtAPDSLX1* 的表达模式受到茉莉酸或水杨酸的诱导。对不同抗性水平苦荞中的 *FtAPDSLX1* 表达量分析结果显示立枯丝核菌抗性材料中 *FtAPDSLX1* 的表达量显著高于立枯丝核菌易感材料。以苦荞代表性品种川荞一号为材料, 克隆得到 *FtAPDSLX1* 基因。生物信息学分析结果显示, *FtAPDSLX1* 基因的 CDS 序列中包含 1143 个碱基对, 编码 380 个氨基酸构成的蛋白质, 该基因启动子具有多个与抗病相关的顺式元件。对 *FtAPDSLX1* 的表达模式进行分析发现, 苦荞幼苗中的 *FtAPDSLX1* 基因表达量受到立枯丝核菌侵染的诱导, 且具有显著的组织特异性。对转 *FtAPDSLX1* 基因拟南芥株系进行抗病表型分析, 结果表明 *FtAPDSLX1* 提高了转基因拟南芥的立枯丝核菌抗性, 同时病菌胁迫下转基因拟南芥中 *FtAPDSLX1* 的表达量显著提高, 并且 *FtAPDSLX1* 提高转基因拟南芥中 SOD、POD 的酶活性。以上结果显示, 苦荞受到立枯丝核菌侵染时, *FtAPDSLX1* 可能参与了对立枯丝核菌的防御机制。*FtAPDSLX1* 的功能验证及相关研究为苦荞抗立枯丝核菌的分子机制解析以及抗病种质资源的筛选奠定了工作基础。

**关键词:** *FtAPDSLX1*; 天冬氨酸蛋白酶; 立枯丝核菌; 过表达; 拟南芥

## Cloning of the *FtAPDSLX1* gene in tartary buckwheat and analysis of its anti-*Rhizoctonia solani* function

YANG Zhimin<sup>1,2</sup>, PENG Xiaoyang<sup>1,2</sup>, HUANG Xu<sup>2</sup>, JIAO Ruyu<sup>1</sup>, LI Wei<sup>2</sup>, GUAN Chaonan<sup>2,3</sup>,  
ZHOU Meiliang<sup>2</sup>, YAN Mingli<sup>1</sup>, XIAO Lu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science and Health, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201; <sup>2</sup> Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; <sup>3</sup> Hainan Provincial Seed Industry Laboratory, Hainan 572025)

**Abstract:** Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) is an annual herbaceous plant of *Fagopyrum* in Polygonaceae, which is a high-quality crop that is homologous of medicine and food. The occurrence of *Fagopyrum* damping-off has seriously affected the promotion and development of Tartary buckwheat planting. This study conducted transcriptome analysis on *Fagopyrum tataricum* treated with jasmonic acid or salicylic acid, revealing that the expression pattern of the aspartic protease gene *FtAPDSLX1* is induced by jasmonic acid or salicylic acid. Further analysis of *FtAPDSLX1* expression levels in *Fagopyrum tataricum* with different resistance degrees revealed a significantly higher expression level of *FtAPDSLX1* in *Fagopyrum tataricum* resistant to *Rhizoctonia solani* compared than in susceptible materials. Using the representative variety of *Fagopyrum tataricum*, Chuanqiao No. 1, the *FtAPDSLX1* gene was cloned. Bioinformatics analysis revealed that the coding sequence of the *FtAPDSLX1* gene contains 1143 base pairs, encoding the protein consisting of 380 amino acids, while its promoter harbors multiple cis-elements associated with disease resistance. Examination of *FtAPDSLX1* expression patterns unveiled its upregulation in Tartary buckwheat seedlings upon *Rhizoctonia solani* invasion, exhibiting pronounced tissue specificity. Phenotypic analysis of disease resistance in transgenic *Arabidopsis* lines harboring the *FtAPDSLX1* gene underscored its role in enhancing resistance against *Rhizoctonia solani*. Furthermore, under pathogen stress, *FtAPDSLX1* expression substantially increased in transgenic *Arabidopsis*, concomitant with heightened enzymatic activities of SOD and POD. These findings suggest that *FtAPDSLX1* may participate in the defense

收稿日期: 2024-04-10

第一作者研究方向为荞麦品质抗逆研究, E-mail: 154193899@qq.com; 彭晓杨为第一共同作者

通信作者: 严明理, 研究方向为作物遗传育种, E-mail: mlyan@hunaas.cn;

肖璐, 研究方向为微生物资源学, E-mail: xiaolu65218@sina.com

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (32301813)

Foundation project: National Natural Science Foundation Youth Program (32301813)

mechanism against *Rhizoctonia solani* in *Fagopyrum tataricum*. The functional validation and related research of *FtAPDSLX1* provide a foundation for unraveling the molecular mechanisms underlying *Fagopyrum tataricum*'s resistance to *Rhizoctonia solani* and for screening disease-resistant germplasm resources.

**Key words:** *FtAPDSLX1*; Aspartic Protease; *Rhizoctonia solani*; overexpression; *Arabidopsis Thaliana*

荞麦 (*Fagopyrum Mill*) 为蓼科荞麦属的一年生或多年生草本或半灌木植物, 在中国西南部、中国北部、欧洲、俄罗斯、尼泊尔和不丹等高海拔地区, 被当地居民用作主食<sup>[1]</sup>。荞麦能提供人体所必需的氨基酸、淀粉等有机物质, 同时芦丁、槲皮素和表儿茶素等黄酮类物质含量极高, 对糖尿病、高血压和高脂血症有治疗作用<sup>[2,3]</sup>。苦荞富含具有杀菌、消炎、抗氧化等功能的类黄酮物质, 被誉为“五谷之王”, 是荞麦的主要栽培种之一, 在我国具有悠久的栽培历史<sup>[4]</sup>。随着健康饮食的观念深入人心, 苦荞作为健康主食和功能性食品生产的重要原材料, 在我国四川、云南、贵州及西藏等地区的种植规模逐渐扩大<sup>[5]</sup>。

荞麦病害不仅会降低荞麦本身营养成分, 同时会导致荞麦大规模减产。荞麦病具有发病种类多, 患病影响大的特点, 目前为止, 国内外报道的荞麦病害共 19 种, 14 种真菌病害 5 种其他病害, 包括 2 种细菌病害, 3 种病毒病, 3 种线虫病<sup>[6]</sup>。荞麦立枯病已经成为世界上农业经济生产中最严重的自然病害之一<sup>[7]</sup>, 是由立枯丝核菌侵害引起的<sup>[8]</sup>, 使用传统杀菌手段并不能对立枯丝核菌的防治起到有效作用, 同时会导致各种土壤问题且对生态环境造成极大的破坏。荞麦种质本身的抗病性与荞麦立枯丝核菌抗性的发生密切相关, 筛选对荞麦立枯丝核菌抗性具有高抗性的作物资源以及发掘抗立枯病的基因是荞麦种质资源工作的重要环节<sup>[9]</sup>。金荞麦 (*F. cymosum*) 被认为是苦荞的原始类型与野生祖先, 对于流行的荞麦病害具有更强的抗病性<sup>[10]</sup>, 常用于与苦荞进行杂交以培育优质种质。

茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 是响应植物逆境胁迫的重要激素<sup>[11]</sup>, 茉莉酸甲酯 (Methyl Jasmonate, MeJA) 可正向调控超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 等相关防御抗性酶的活性<sup>[12]</sup>, 同时抑制一系列脱氢酶的活性, 以此达到提高相关抗性基因表达的目的, 从而提高植物对病害侵染的抵抗能力。水杨酸 (salicylic acid, SA) 及其受体蛋白 NPR1 介导的 SA 信号通路参与组成了植物免疫, 对维持植物基础抗性和建立系统获得抗性具有重要意义, 并且一定程度上具有广谱的抗病功能<sup>[13,14]</sup>。本研究对茉莉酸、水杨酸处理过的苦荞进行转录组测序, 发现一个属于天冬氨酸肽酶结构域超家族 (Aspartic peptidase domain superfamily) 基因 *FtAPDSLX1* 在叶片与茎部具有较高的表达量, 其表达模式受到茉莉酸与水杨酸的诱导。实验室前期结合多组学分析揭示了茉莉酸介导的苦荞立枯病抗性的分子机制, 定位到一个天冬氨酸蛋白酶基因 (*FtASP*), 该基因具有抗菌肽功能, 可以减缓真菌的生长<sup>[15]</sup>。因此我们推测同为天冬氨酸蛋白酶的 *FtAPDSLX1* 在苦荞中可能具有抗病相关功能。以栽培种苦荞种质川荞 1 号为试验材料进行 PCR 扩增, 克隆得到 *FtAPDSLX1*, 并对其理化性质和生理功能进行了深入探索。通过亚细胞定位技术, 观察 *FtAPDSLX1* 在细胞中的分布情况。通过荧光定量 PCR 对 *FtAPDSLX1* 在苦荞中的表达模式进行分析。构建 *FtAPDSLX1* 转基因拟南芥对其立枯丝核菌抗性进行鉴定, 推测该基因是一个新的抗病相关基因。对该基因的深入研究不仅对解析苦荞抗立枯丝核菌的分子机制具有重要作用, 同时为栽培种苦荞抗病种质筛选提供了理论基础。

# 1. 材料与方法

## 1.1 实验材料

本文所使用的苦荞种质资源（NPL324、GS181、GZ269、HB93、SX122、SX96、HB384、YN306、QH361、GS194 以及川荞一号）、立枯丝核菌菌株（*Rhizoctonia solani* AG4-HGI3）、感受态细胞以及载体等均由中国农科院作科所荞麦基因资源组提供。

## 1.2 苦荞总 RNA 的提取以及反转录

根据 RNAprep Pure Plant Kit【天根生化科技（北京）有限公司】说明书要求，选取长势正常的 50 mg~100 mg 苦荞幼苗为样品提取 RNA。进行吸光值检测和琼脂糖凝胶电泳鉴定后反转录为 cDNA，并于-20℃环境下进行保存备用。

## 1.3 转录组测序

培育苦荞无菌苗，将发育良好的无菌苗整株放入分别加有水杨酸和茉莉酸的 MS 液体培养基中，于 28℃ 摇床中培育，分别于 0 h、1 h、4 h 和 12 h 进行取样，取样后用液氮速冻。采样后利用液氮进行速冻。所有收集的样品均于干冰中进行储存并送往公司测序。

## 1.4 苦荞 *FtAPDSLX1* 基因的克隆与生物信息学分析

使用 SnapGene 设计 CDS 的全长扩增引物（详见表 1），并利用聚合酶链式反应（PCR）技术扩增得到 *FtAPDSLX1* 基因全长 CDS。通过琼脂糖凝胶电泳将 PCR 扩增产物分离，对正确条带进行回收和产物纯化。利用纯化产物进行 T 载连接，并转化至大肠杆菌 DH5  $\alpha$  感受态细胞。转化好的感受态细胞均匀涂抹在带有 AMP 抗性的 LB 固体培养基上，37℃ 过夜培养，次日挑选单菌落，PCR 鉴定并测序，得到包含 *FtAPDSLX1* 基因的质粒。

在荞麦基因组和表型数据库网站查询得到 *FtAPDSLX1* cDS 序列，运用 ExPASy 网站查询 FtAPDSLX1 蛋白理化性质，用 PHYRE2 网站查询 FtAPDSLX1 蛋白二级结构并使用 Swiss Model 对其三级结构进行作图。使用 PLANTCARE 对 *FtAPDSLX1* 基因启动子序列进行分析，通过 UNIPROT 在线网站将 FtAPDSLX1 蛋白序列与不同物种进行比对，并使用 MEGA11 进行系统发育树的绘制。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence (5' -3')	用途 Function
<i>FTAPDSLX1-F</i>	ATGGCGGAGGCAATCACGA	基因克隆
<i>FTAPDSLX1-R</i>	TTAGTAGAGTGGCCCAATG	
<i>1307-FTAPDSLX1-F</i>	GACTTGAAGCTCGGTATCTAGAATGGCGGAGGCAATCACGA	构建过表达载体
<i>1307-FTAPDSLX1-R</i>	CTTGATATCGAATTCCTGCAGTTAGTAGAGTGGCCCAATG	
<i>1307-F</i>	CTCAAGCAATCAAGCATTCTAC	1307 通用引物
<i>1307-R</i>	GAGAGACTGGTGATTTTTCG	
<i>FtH3-qPCR-F</i>	GAAATTCGCAAGTACCAGAAGAG	qRT-PCR 苦荞内参基因
<i>FtH3-qPCR-R</i>	CCAACAAGGTATGCCTCAGC	
<i>Actin7-qPCR-F</i>	TCCATGAAACAACCTTACAACCTCCATCA	qRT-PCR 拟南芥内参基因
<i>Actin7-qPCR-R</i>	CATCGTACTCACTCTTTGAAATCCACA	
<i>qPCR-FTAPDSLX1-F</i>	GAAGCACCCAACCTCAAGCATAGCT	qRT-PCR
<i>qPCR-FTAPDSLX1-R</i>	ACCCTTTCCTCGAGGCACTCA	



### 1.5 苦荞 *FtAPDSLX1* 基因的表达分析

1.5.1 不同抗病水平苦荞种质中 *FtAPDSLX1* 基因的表达量 选择五份对立枯丝核菌具有抗性的材料 NPL324、GS181、GZ269、HB93、SX122 以及五份对立枯丝核、菌表现为易感的材料 SX96、HB384、YN306、QH361、GS194 进行 RNA 提取以及反转录。利用 SnapGene 设计候选基因 *FtAPDSLX1* 的荧光定量引物对 qPCR-*FtAPDSLX1*-F/R。以上述材料的 cDNA 为模板进行 *FtAPDSLX1* 在不同抗病等级苦荞种质的表达量分析。

1.5.2 苦荞 *FtAPDSLX1* 基因的表达分析 用立枯丝核菌接种长势良好的苦荞麦川荞 1 号无菌苗，于 28 °C 环境下培养 0 h、6 h、12 h、24 h 后对叶、茎、根进行取样，并提取总 RNA，以测定 *FtAPDSLX1* 基因在苦荞不同组织中的相对表达量。

将 *FtAPDSLX1* 转基因拟南芥株系 (*OE1*、*OE2*、*OE3*) 和野生型拟南芥 (*WT*) 在室温为 28°C，相对湿度为 75% ~ 80% 的环境下光照 16 h / 黑暗 8 h 培养三周。同一花盆中种植 4 株拟南芥为一组，不同株系分别选取 3 组拟南芥，利用立枯丝核菌进行不同时间段 (0 h、6 h、12 h、24 h) 的侵染并取样。将所得到的样品进行 RNA 提取并进行反转录得到 cDNA。利用 qRT-PCR 方法对不同侵染时间段下的野生型拟南芥 (*WT*) 和 *FtAPDSLX1* 转基因拟南芥株系的相对表达量进行分析。

1.5.3 实时荧光定量 PCR 利用 SnapGene 根据 *FtAPDSLX1* 基因的非保守区间，设计荧光定量引物对 *FtAPDSLX1*-qPCR-F/R (表 1)。荞麦组成型表达基因 *FtH3* 作为内参基因 (表 1)。采用荧光定量试剂盒和实时荧光定量 PCR 仪器进行 RT-qPCR 检测和分析。

### 1.6 亚细胞定位融合载体的构建

构建亚细胞定位融合载体 pCAMBIA1305-*FtAPDSLX1*-GFP，并将其与 1305-GFP 空载体采用农杆菌介导法分别通过注射使其瞬时共转化到本氏烟草叶片背面作为实验组和对照组，实验组与对照组中均加入核 marker，避光培养 12 h 后，置于正常条件下培养 48 h。使用激光共聚焦显微镜进行观察。

### 1.7 植物表达载体的构建及拟南芥的遗传转化

1.7.1 pCAMBIA1307-*FtAPDSLX1* 过表达载体的构建 利用测序比对正确的 *FtAPDSLX1* 菌液提取目的质粒，依据 pCAMBIA1307 图谱和酶切位点 BamHI 和 KpnI 设计引物 *FtAPDSLX1*-1307F/R (表 1) 进行 PCR 反应扩增，利用 1% 琼脂糖核酸凝胶对 PCR 产物进行检测，选取正确条带并进行胶回收，与经过双酶切的回收 pCAMBIA1307 进行同源重组，转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞，经培养鉴定以及测序比对后得到 *FtAPDSLX1*-1307 过表达载体菌株，向其中加入甘油后于 -80°C 冰箱中保存备用。

1.7.2 转化农杆菌 GV3101 及侵染拟南芥 提取 pCAMBIA1307-*FtAPDSLX1* 质粒，并利用检测合格的重组质粒转化农杆菌 GV3101 感受态细胞，经过培养并进行鉴定后得到 *FtAPDSLX1* 阳性农杆菌菌液。利阳性农杆菌菌液制备拟南芥侵染工作液，使用蘸花法对抽苔的野生型拟南芥的花蕾进行侵染，收种后得到 *FtAPDSLX1* 转基因拟南芥 T0 代种子，进行发苗筛选后得到 T1 代转基因拟南芥。选取 T1 代幼苗的叶片作为样品进行基因组 DNA 提取，并对得到的基因组 DNA 进行鉴定，检测后获得 *FtAPDSLX1* 转基因植株 *OE1*、*OE2*、*OE3*。

### 1.8 *FtAPDSLX1* 转基因拟南芥的病菌侵染分析

将 *FtAPDSLX1* 转基因株系 *OE1*、*OE2*、*OE3* 种子和野生型对照 *WT* 种子经无水乙醇消毒干燥后均匀撒在 MS 固体营养板上。一段时间后，将长出真叶的 *FtAPDSLX1* 转基因株系和 *WT* 的幼苗移植于花盆中，

并在室温 22 °C 的环境下进行 16 h 光照 / 8 h 黑暗培养。一段时间后得到 *FtAPDSLX1* 转基因株系和 WT 拟南芥，选取 *FtAPDSLX1* 转基因株系和 WT 的离体叶片作为样品进行表型分析。将储存的立枯丝核菌菌株（*Rhizoctonia solani* AG4-HGI3）进行活化后涂布于 PDB 培养基上进行培养，得到活力较高的立枯丝核菌菌板。选取 *FtAPDSLX1* 转基因株系和 WT 的离体叶片分别置于培养皿中，并在叶片下垫入湿润的滤纸以保持叶片湿度，将叶片均分为两组，一组利用大小一致、活性正常的立枯丝核菌菌饼对离体叶片表面进行接种，以观察 *FtAPDSLX1* 转基因株系和野生型对照 WT 病菌侵染下的发病情况，一组不进行处理作为对照组。将培养皿利用封口膜进行封闭保湿处理后，于 28 °C 环境下暗培养 24 h 后观察不同实验组的发病情况。并对 *FtAPDSLX1* 转基因株系和野生型对照 WT 的发病率及病斑面积占比进行统计。利用 DAB 染色液对处理过后的 *FtAPDSLX1* 转基因株系和 WT 的离体叶片进行染色以进一步观察病斑情况。对不同处理下的 *FtAPDSLX1* 转基因株系和野生型对照 WT 进行 *FtAPDSLX1* 基因的表达模式进行分析，并对体现抗病功能相关的酶活性进行测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 *FtAPDSLX1* 对苦荞抗立枯丝核菌的调控作用

2.1.1 SA 和 JA 诱导 *FtAPDSLX1* 的表达 转录组分析结果显示，苦荞中的 *FtAPDSLX1* 于 JA 处理 1 h 后表达量达到峰值（图 1A）。而在 SA 处理的苦荞中，*FtAPDSLX1* 在 4 h 时表达量达到峰值（图 1B），且 12 h 时 *FtAPDSLX1* 表达量与 4 h 一致。前人研究表明，在葡萄抗病研究中，茉莉酸在抗白腐过程中发挥作用，而水杨酸在抗白粉病过程中诱导相关抗性基因表达<sup>[16,17]</sup>。我们推测 *FtAPDSLX1* 可能参与 JA 或 SA 介导的苦荞对立枯丝核菌的防御机制。

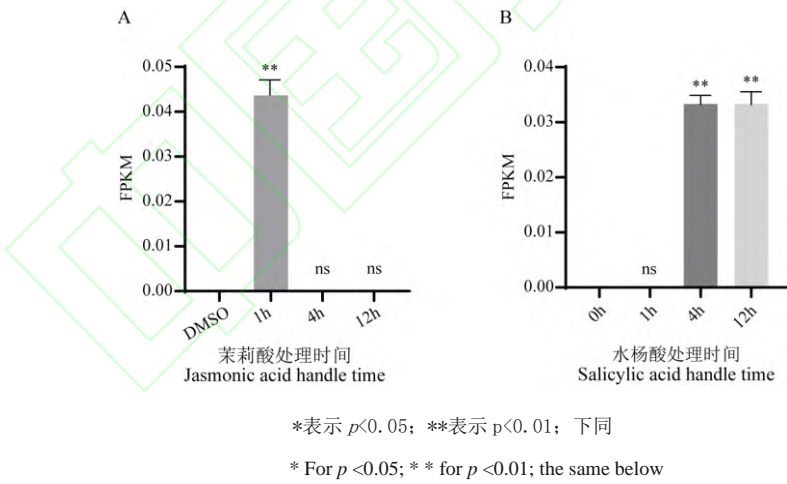


图 1 JA/SA 处理后苦荞中 *FtAPDSLX1* 转录分析

Fig.1 Transcription analysis of *FtAPDSLX1* in Tartary buckwheat after JA/SA treatment

2.1.2 *FtAPDSLX1* 高抗病材料中高表达 为了检验 *FtAPDSLX1* 在不同抗性水平材料中的表达量是否存在差异，通过 qPCR 对 *FtAPDSLX1* 在立枯丝核菌抗性材料与易感材料中的表达量进行分析（图 2），结果显示在立枯丝核菌抗性种质 NPL324、GS181、GZ269、HB93、SX122 中 *FtAPDSLX1* 表达量均显著高于立枯丝核菌易感种质 SX96、HB384、YN306、QH361、GS194。进一步表明了 *FtAPDSLX1* 与苦荞对立枯丝核菌的抗性具有紧密联系。

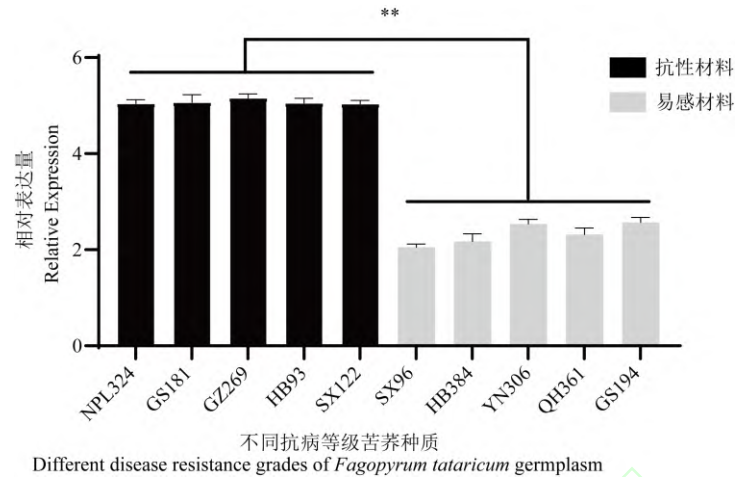
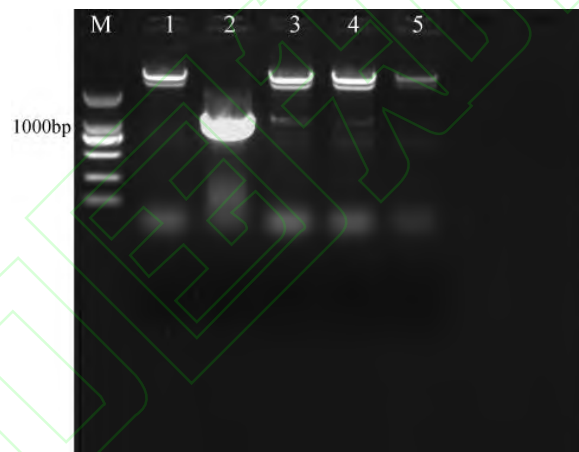


图 2 *FtAPDSLX1* 在不同抗病等级苦荞种质中的表达模式

Fig.2 Expression pattern of *FtAPDSLX1* in buckwheat germplasm with different disease resistance grades

## 2.2 苦荞 *FtAPDSLX1* 的克隆与生物信息学分析

利用聚合酶链式反应（PCR）技术扩增得到 *FtAPDSLX1* 基因全长 CDS，通过琼脂糖凝胶电泳将 PCR 扩增产物分离。根据图 3 显示，2 号泳道中分离得到的条带大小大约为 1000 bp，而 *FtAPDSLX1* 基因 CDS 为 1143 bp，并将产物进行测序比对，结果证明该条带即是目的基因。



M: DL 2000 maker; 1、3、4、5: PCR 失败产物条带; 2: 目的条带

M: DL 2000 marker; 1, 3, 4, 5: Bands of failed PCR products; 2: Target band

图 3 *FtAPDSLX1* 基因 PCR 产物电泳结果

Fig.3 Electrophoresis results of PCR products of *FtAPDSLX1* gene

生物信息学分析得到关于 *FtAPDSLX1* 基因及其编码蛋白的详细信息。*FtAPDSLX1* 基因的 CDS 序列长度为 1143 bp（1143 碱基对），这些碱基对按照特定的顺序排列，编码了 380 个氨基酸构成的蛋白质。并得出 *FtAPDSLX1* 蛋白的性质，其中包括其理论相对分子量，根据氨基酸序列计算得出，大约为 42.33 kDa。等电点（pI）是一个描述蛋白质在特定 pH 条件下电荷状态的性质，对于理解蛋白质在生物体内的相互作用非常重要，*FtAPDSLX1* 蛋白的理论等电点为 5.50。蛋白的稳定性可以通过不稳定指数来评估，该指数基于蛋白质序列中氨基酸的组成进行计算，通常不稳定指数大于 40 时，表示蛋白是不稳定的。*FtAPDSLX1* 蛋白的不稳定指数为 53.32，是一个不稳定蛋白。亲水性/疏水性分析是评估蛋白质在水环境中溶解性的重要步骤。*FtAPDSLX1* 蛋白亲水性为 -0.352，是亲水性蛋白。

FtAPDSLX1 蛋白的二级结构（图 4A）主要由  $\alpha$ -螺旋、延伸链、 $\beta$ -转角和无规则卷曲组成，分别占比 27.89%、15.53%、3.16%和 53.42%。基于金荞较之苦荞具有更强的抗病性，因此通过氨基酸序列在金荞中比对得到 FtAPDSLX1 蛋白的同源蛋白 FD07G01375 并对二级结构进行预测（图 4B），FD07G01375 蛋白二级结构由 30.36%  $\alpha$ -螺旋，16.96% 延伸链，4.05%  $\beta$ -转角以及 48.35% 无规则卷曲。FD07G01375 蛋白相较于 FtAPDSLX1 蛋白在二级结构上具有更多的  $\alpha$ -螺旋以及  $\beta$ -转角。通过三级结构模型作图（图 4C、D），结果与二级结构大体一致。对 FtAPDSLX1 蛋白与 FD07G01375 蛋白保守结构域进行分析，结果显示 FtAPDSLX1 蛋白的天冬氨酸蛋白酶结构域与 FD07G01375 蛋白之间存在差异，可能导致金荞与苦荞之间抗病性的不同。

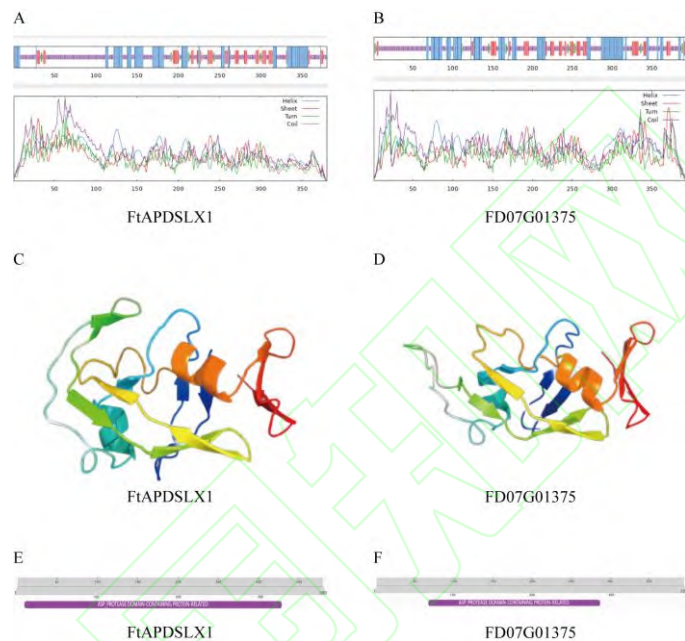


图 4 FtAPDSLX1 同源蛋白结构比对

Fig.4 Structural alignment of FtAPDSLX1 homologous proteins

对 *FtAPDSLX1* 基因上游序列进行分析，结果显示在 *FtAPDSLX1* 基因启动子中除了存在一系列激素响应元件如生长素响应元件 TGA-element、赤霉素响应元件 P-box、脱落酸应答顺式元件 ABRE 外，还存在 G-BOX、MYB 和 MYC 等与抗逆相关的顺式作用元件以及病原菌诱导响应元件 W-BOX（图 5，表 2）。进一步可以推测 FtAPDSLX1 在苦荞中具有一定的抗病性。

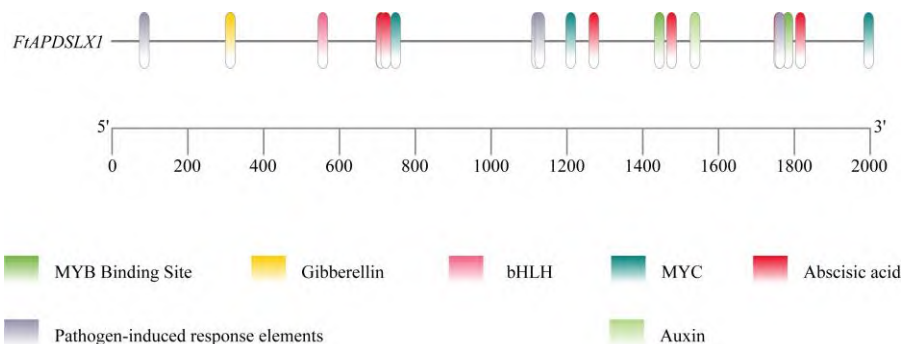


图 5 *FtAPDSLX1* 启动子结构

Fig.5 The structure of *FtAPDSLX1* promoter



表 2 *FtAPDSLX1* 基因启动子顺式作用元件

Table 2 Cis-elements in *FtAPDSLX1* gene promoter

位点名称	位点功能	元件数量
Site name	Function of site	Quantity of element
MYB	Anti stress related	6
TGA-element	auxin-responsive element	1
ABRE	A cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness	7
	cis-acting regulatory element involved in zein	5
O2-site	metabolism regulation	
P-box	gibberellin-responsive element	1
Sp1	light responsive element	5
Myb-binding site	Anti stress related	3
ARE	regulatory element essential for the anaerobic induction	2
GC-motif	element involved in anoxic specific inducibility	2
	A cis-acting regulatory element involved in light responsiveness	3
G-box		
	A part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	1
Box 4		

为了解 *FtAPDSLX1* 蛋白在物种中的亲缘关系，通过 UNIPROT 在线网站检索 *FtAPDSLX1* 蛋白序列,得到相思豆 (*Abrus precatorius*)、小粒咖啡 (*Coffea arabica*)、大豆 (*Glycine soja*)、向日葵 (*Helianthus annuus*)、核桃 (*Juglans regia*)、莴苣 (*Lactuca sativa*)、苹果属植物山定子 (*Malus baccata*)、莲 (*Nelumbo nucifera*)、海枣 (*Phoenix dactylifera*)、梨 (*Pyrus ussuriensis x Pyrus communis*)、芝麻 (*Sesamum indicum*)、菠菜 (*Spinacia oleracea*) 以及生姜 (*Zingiber officinale*) 等物种的蛋白序列与 *FtAPDSLX1* 蛋白序列具有一定的同源性，利用软件 MEGA11 进行比对分析，并绘制系统进化树（图 6），结果表明 *FtAPDSLX1* 与生姜 (*A0A8J5FNQ4\_ZINOF*) 的蛋白序列更为接近。

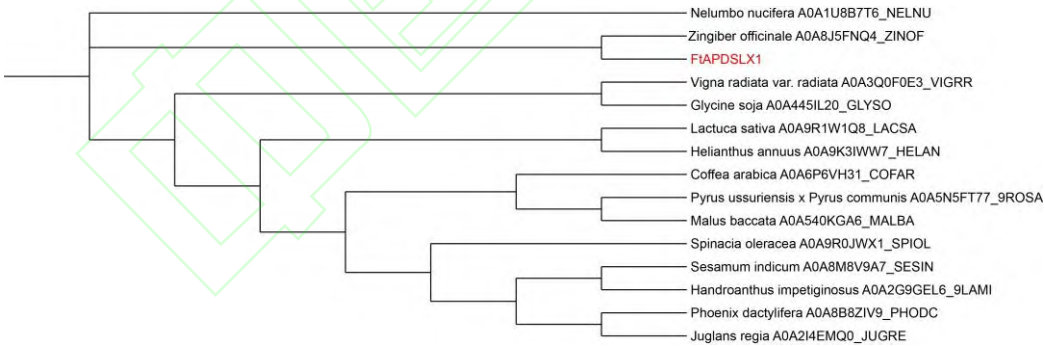


图 6 *FtAPDSLX1* 不同物种同源蛋白分析

Fig.6 Analysis of homologous proteins of *FtAPDSLX1* in different species

### 2. 3 *FtAPDSLX1* 蛋白的表达模式分析

2. 3. 1 *FtAPDSLX1* 蛋白的亚细胞定位 天冬氨酸蛋白酶主要分布于植物的细胞质中，根据天冬氨酸蛋白酶的不同功能，其亚细胞定位具有显著差异性。构建亚细胞定位融合载体 1305-*FtAPDSLX1*-GFP 并用农杆菌介导法分别通过注射使其瞬时共转化到本氏烟草叶片背面，进行培养后使用激光共聚焦显微镜观察发现（图 7），*FtAPDSLX1* 在细胞核与细胞质中均有分布。

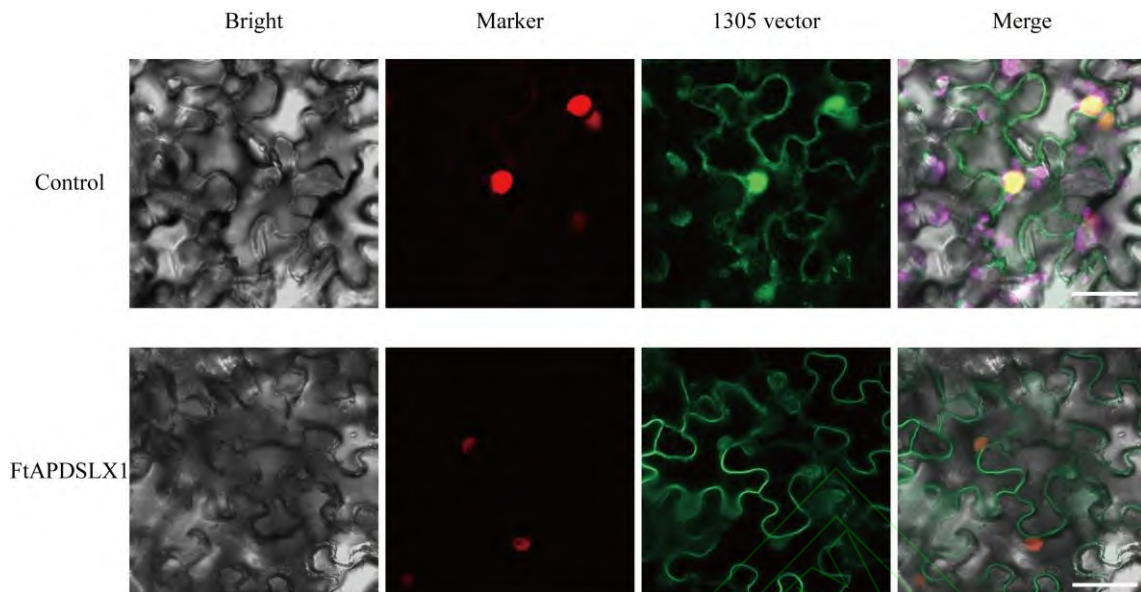
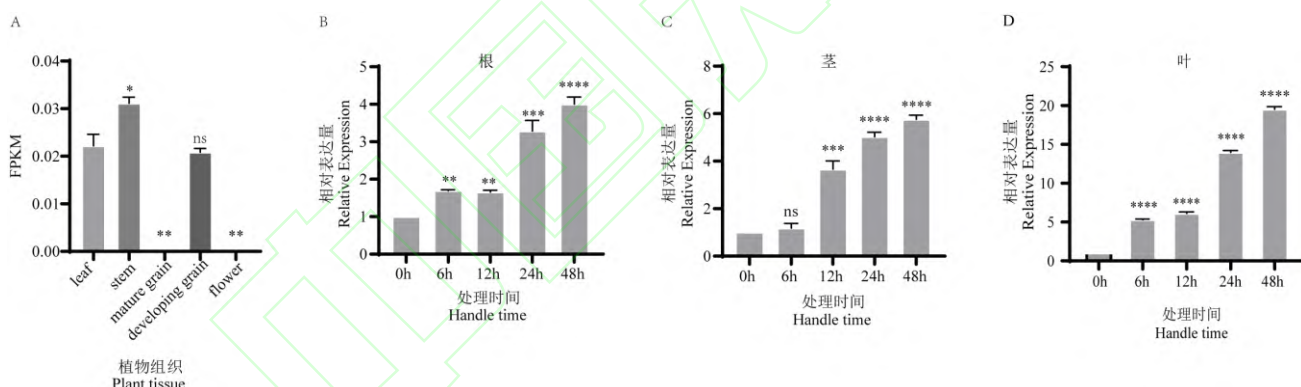


图 7 *FtAPDSLX1* 亚细胞定位信号 (Bar = 20  $\mu$ m)

Fig.7 Subcellular localization signal of *FtAPDSLX1* (Bar = 20  $\mu$ m)

2.3.2 *FtAPDSLX1* 基因的表达模式分析 对实验鼠已有转录组数据进行分析发现, *FtAPDSLX1* 主要在叶片、茎以及发育期籽粒中表达 (图 8A)。为了进一步确定立枯丝核菌侵染过程中 *FtAPDSLX1* 的响应模式, 通过 qRT-PCR 对 *FtAPDSLX1* 在受立枯丝核菌侵染不同时间段的苦荞组织的表达量进行检测。结果表明, 苦荞 *FtAPDSLX1* 基因在立枯丝核菌胁迫下被诱导从而上调表达。



A: 苦荞不同组织中 *FtAPDSLX1* 的表达量; B: 苦荞幼苗立枯丝核菌侵染 24 h 根系中 *FtAPDSLX1* 相对表达量;

C: 苦荞幼苗立枯丝核菌侵染 24 h 茎段中 *FtAPDSLX1* 相对表达量; D: 苦荞幼苗立枯丝核菌侵染 24 h 叶片中 *FtAPDSLX1* 相对表达量

A: Expression levels of *FtAPDSLX1* in different tissues of Tartary buckwheat; B: Relative expression of *FtAPDSLX1* in the roots of *RS* infected for 24 h;

C: relative expression of *FtAPDSLX1* in the stem of *RS* infected for 24 h; D: Relative expression of *FtAPDSLX1* in leaves of *RS* infected for 24 h

图 8 苦荞中 *FtAPDSLX1* 的表达模式

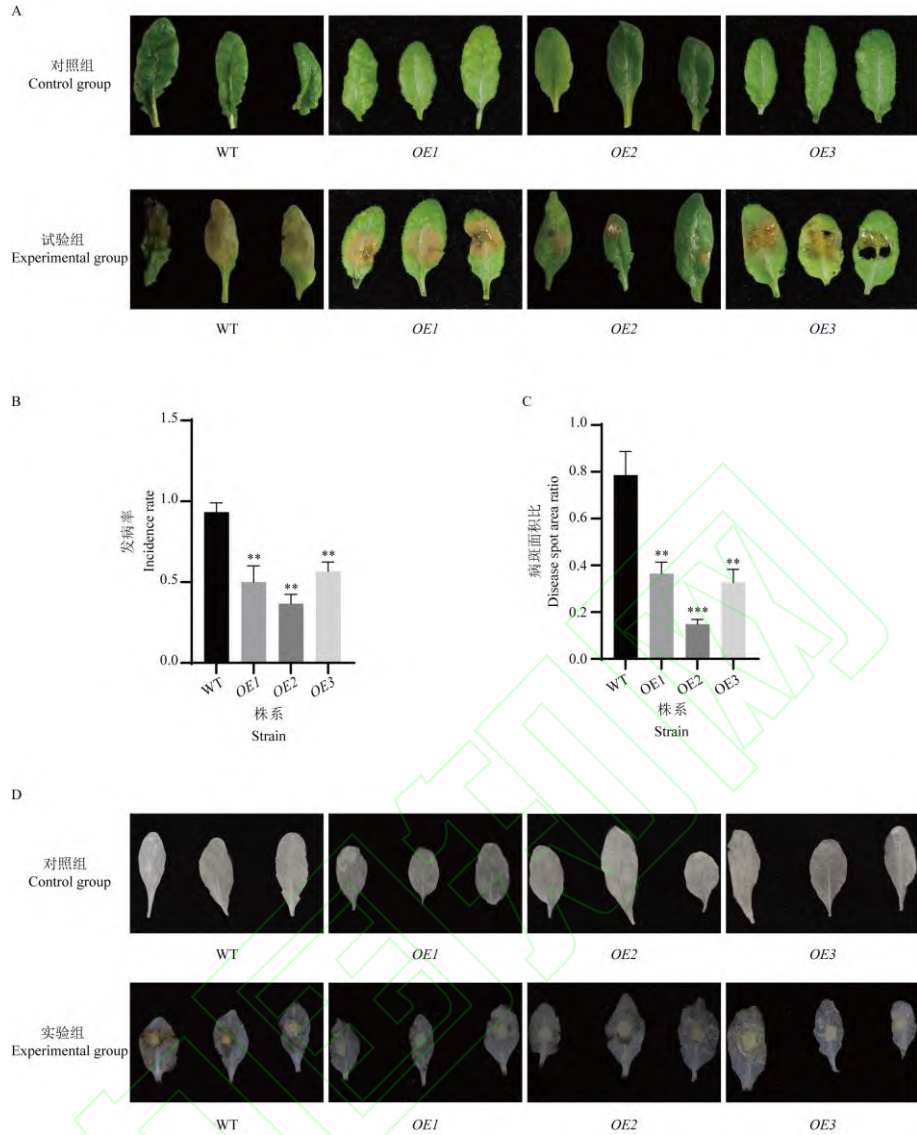
Fig.8 Relative expression level of *FtAPDSLX1* in *Fagopyrum tataricum* under *Rhizoctonia solani* stress

苦荞幼苗的根茎叶在不同时间段立枯丝核菌侵染条件下, *FtAPDSLX1* 的表达量呈现显著的组织特异性 (图 8)。苦荞幼苗在立枯丝核菌侵染胁迫下, 不同时间段中茎段和叶片中 *FtAPDSLX1* 表达量均高于根部, 且呈现出明显的时空表达特异性。在 0~48 h 内, 苦荞根茎叶中 *FtAPDSLX1* 基因表达量均显著上调。根据 *FtAPDSLX1* 表达量趋势可推测, *FtAPDSLX1* 参与苦荞对立枯丝核菌侵染胁迫的防御机制, 在 0~24 h 内基因表达上调且表达量增长速率较高, 而在 12~48 h 期间, 可能由于病菌侵染时间较长, 苦荞幼苗机体受损严重导致部分生理反应无法正常进行, *FtAPDSLX1* 的表达量增长速率下降。

## 2.4 *FtAPDSLX1* 转基因表型分析

**2.4.1 *FtAPDSLX1* 提高了转基因拟南芥的立枯丝核菌抗性** 为了鉴定转 *FtAPDSLX1* 基因拟南芥的抗病性，利用转 *FtAPDSLX1* 基因拟南芥与野生型拟南芥离体叶片进行立枯丝核菌接种。结果显示（图 9A），接种 24 h 后，对照组中的离体叶片之间并未呈现出显著不同；试验组 WT 的离体叶片，立枯丝核菌侵染痕迹面积较 *OE1*、*OE2*、*OE3* 的更为明显。对发病指数进行统计，结果显示（图 9B），野生型拟南芥 WT 离体叶片平均发病率达 93%，而转基因拟南芥株系中，*OE1* 的平均发病率为 53%，*OE2* 平均发病率为 43%，*OE3* 平均发病率为 57%。转 *FtAPDSLX1* 基因拟南芥株系各组的离体叶片平均发病率均远远低于野生型拟南芥 WT 离体叶片。对拟南芥立枯丝核菌接种后的病害程度进行统计（图 9C），结果显示野生型 WT 拟南芥离体叶片病斑面积占叶片面积的比值显著大于转 *FtAPDSLX1* 基因拟南芥株系离体叶片病斑面积占叶片面积的比值。根据以上结果可说明，无论从病害程度抑或是发病率而言，转 *FtAPDSLX1* 基因拟南芥株系 *OE1*、*OE2*、*OE3* 对立枯丝核菌的抗性均显著强于野生型拟南芥 WT。

二氨基联苯胺（Diaminobenzidine, DAB）在过氧化物酶催化作用下发生化学反应，在反应点位滋生出棕褐色沉淀物。DAB 染色实验结果（图 9D）进一步说明了 *FtAPDSLX1* 转基因拟南芥对立枯丝核菌的抗性显著强于野生型拟南芥。实验组中 *OE1*、*OE2*、*OE3* 和 WT 叶片上均呈现明显棕褐色沉淀，而对照组中转基因拟南芥和野生型拟南芥离体叶片无显著差异。同时立枯丝核菌侵染 24 h 后，WT 离体叶片立枯丝核菌侵染痕迹较转基因株系离体叶片更为明显。进一步说明了转 *FtAPDSLX1* 基因拟南芥对立枯丝核菌的抗性显著强于野生型拟南芥。



A: 拟南芥病菌感染结果; B: 拟南芥发病率统计; C: 拟南芥病害程度统计; D: DAB 染色结果  
A: Infection results of *Arabidopsis thaliana* by pathogens; B: Statistics of *Arabidopsis thaliana* disease incidence;  
C: Statistics of *Arabidopsis thaliana* disease severity; D: DAB staining results

图 9 转基因拟南芥立枯丝核菌处理后的表型分析

Fig.9 Phenotype analysis of transgenic *Arabidopsis thaliana* after treated with *Rhizoctonia solani*

**2.4.2 病菌胁迫下转基因拟南芥中 *FtAPDSLX1* 的表达量显著提高** 为了验证转基因拟南芥与野生型拟南芥的抗病性差异是否与 *FtADSPLX1* 的表达量相关, 因此通过 qRT-PCR 对立枯丝核菌侵染不同时间段处理的野生型拟南芥 WT 和转基因拟南芥株系 OE1、OE2、OE3 进行 *FtAPDSLX1* 表达模式测定。测定结果 (图 10) 显示立枯丝核菌侵染 0~24 h 期间, 转基因拟南芥中 *FtAPDSLX1* 的表达量均远远高于野生型拟南芥 WT, 而在 24~48 h *FtAPDSLX1* 表达量增长速率下降时期, 转基因拟南芥 OE 中 *FtAPDSLX1* 的表达量达到了野生型拟南芥的五倍以上。上述结果表明, 在立枯丝核菌侵染的胁迫下, 转基因拟南芥中 *FtAPDSLX1* 基因可能参与响应拟南芥抗病生理机制, *FtAPDSLX1* 表达量的显著提高, 进而增强了转基因拟南芥的抗病性。



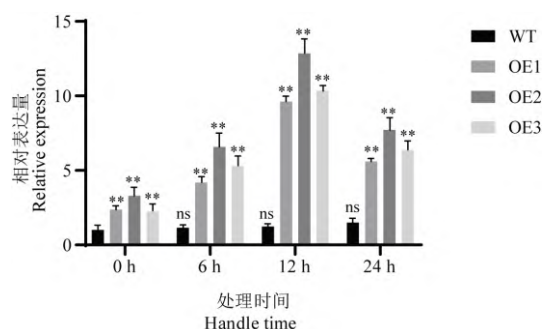
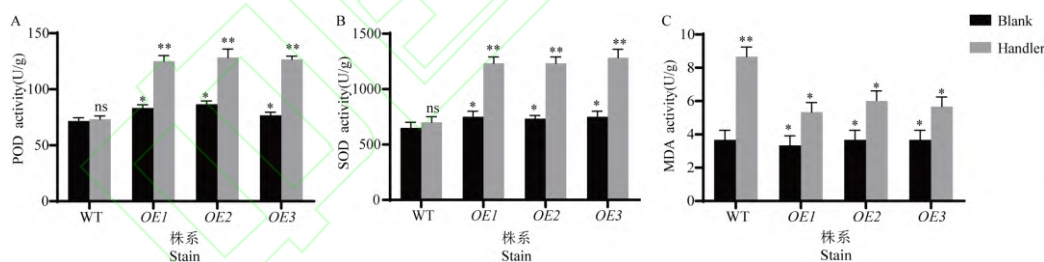


图 10 立枯丝核菌侵染下转基因拟南芥株系 *FtAPDSLX1* 表达量分析

Fig.10 Analysis of expression level of transgenic *Arabidopsis thaliana* line *FtAPDSLX1* under *Rhizoctonia solani* infection

**2. 4. 3 *FtAPDSLX1* 提高转基因拟南芥中抗病性相关酶的活性** 为了进一步确定转基因拟南芥的抗性是否显著提高, 对转基因拟南芥与野生型拟南芥中的抗病性相关酶活性进行检测。POD 和 SOD 作为 ROS 清除相关的抗氧化酶, 其活性的升高可降低自由基对细胞膜损伤, 降低植株所受到的氧化损伤<sup>[28]</sup>。在针对植物的抗逆和抗病生理研究中, 通过对 MDA 活性进行测定可以侧面反映植物细胞的膜受损程度以及相应环境下植物响应胁迫的能力强弱<sup>[31]</sup>。结果显示 (图 11), 经过立枯丝核菌侵染 24 h 后, 野生型拟南芥 WT 中 POD 活性与未经处理的对照组相比并未呈现出明显差异; 而转 *FtAPDSLX1* 基因拟南芥株系中, 拟南芥 POD 活性较对照组而言发生了显著升高。转 *FtAPDSLX1* 基因拟南芥经过立枯丝核菌侵染 24 h 后, 与未处理的对照组相比, SOD 活性发生了明显的上调。野生型拟南芥 WT 在经过立枯丝核菌侵染 24h 后, 其体内的 MDA 活性与正常条件下相比发生了显著的提高; 转 *FtAPDSLX1* 基因株系经过立枯丝核菌处理后的 MDA 活性同样发生了上升, 但与野生型 WT 拟南芥相比, 转 *FtAPDSLX1* 基因拟南芥 MDA 活性的上升幅度受到了明显的抑制。结果说明, 在受到立枯丝核菌胁迫时转 *FtAPDSLX1* 基因株系会上调体内的 SOD 和 POD 活性, 并通过某种生化途径在一定程度上对 MDA 活性进行抑制, 表明与野生型 WT 相比, 转 *FtAPDSLX1* 基因株系抗病性较强。



Blank: 未处理; Handler: 立枯丝核菌侵染 24 h

Blank: Untreated; Handler: Infected with *Rhizoctonia solani* for 24 hours

A: 拟南芥 POD 活性检测结果; B: 拟南芥 SOD 活性检测结果; C: 拟南芥 MDA 活性检测结果;

A: *Arabidopsis thaliana* POD activity test results; B: *Arabidopsis thaliana* SOD activity test results; C: *Arabidopsis thaliana* MDA activity test results.

图 11 转基因拟南芥抗病性相关生理指标检测

Fig.11 Detection of physiological indicators related to disease resistance of transgenic *Arabidopsis thaliana*

### 3 讨论

立枯丝核菌是一种能诱导植物严重发病的土传病原真菌<sup>[18,19]</sup>, 感染荞麦后会引发荞麦立枯病。苦荞植株遭到立枯丝核菌感染后, 发病部位主要为叶片上, 症状为出现椭圆形或不规则褐色病斑; 同时会引起苦荞茎部凹陷性病变并且出现深棕色病斑, 一段时间后引起植株坏死<sup>[20]</sup>。迄今为止, 关于荞麦对立枯丝核菌的抗性机制尚未得到清晰的解析。本研究通过对 SA、JA 处理过的苦荞进行转录组测序分析发现, 在外源施

加 SA 或 JA 过后,天冬氨酸蛋白酶基因 *FtAPDSLX1* 的表达模式出现显著变化,通过生物信息学分析推测其属于天冬氨酸蛋白酶家族(图 4)。

20 世纪 90 年代, *Rodrigo* 等<sup>[21,22]</sup>通过烟草与番茄克隆得到天冬氨酸蛋白酶,并证实其参与了病程相关蛋白的降解。*CDR1* 作为拟南芥中编码天冬氨酸蛋白酶的基因,在拟南芥中当它的表达被上调时,植株呈现出矮化抗病的表型;而当该基因表达受到抑制时,植株的抗病性显著下降<sup>[23]</sup>。*CDR1* 在水稻中存在同源基因 *OsCDR1*,在水稻受到植物抗病诱导剂 SA 和苯并噻二唑诱导情况后, *OsCDR1* 的表达量显著上调,说明 *OsCDR1* 可能参与了水稻的抗病机制<sup>[24]</sup>。

实验室前期工作证明,苦荞中由茉莉酸介导的天冬氨酸蛋白酶基因 *FtASP*,具有抗病相关功能,其蛋白对真菌的生长起到抑制作用<sup>[15]</sup>。因此,我们推测 *FtAPDSLX1* 可能参与苦荞中 SA 或 JA 信号途径。不同抗性水平苦荞中 *FtAPDSLX1* 的表达量测定发现, *FtAPDSLX1* 在高抗病材料中的表达量更高(图 2),因此我们推测 *FtAPDSLX1* 可能在苦荞抗立枯病分子机制中发挥重要作用。对 *FtAPDSLX1* 启动子序列进行分析发现,其启动子中存在大量激素响应元件(图 5)。激素响应往往与植物参与抗病息息相关,特别是涉及到 SA 或 JA 信号途径。比如在水稻中, *OsWRKY13* 能增强水稻对病害的防御, *OsWRKY13* 的表达受到防御信号分子的影响,SA 处理 5 min 后持续激活 *OsWRKY13* 表达,而 JA 从 5 min 开始激活,30 min 开始消失<sup>[25]</sup>。促进水稻抗病毒防御的核心 RNA 沉默元件 *AGO18* 在茉莉酸甲酯处理 1 h 后 mRNA 水平上升,而在此期间,多个 JA 通路基因 *OsCOIIA*、*OsJAMYB* 和 *OsJAZ6* 的表达量也同步增加<sup>[26]</sup>。与之相似的是在本研究中 *FtAPDSLX1* 在 JA 处理 1 h 时表达量上升;在 SA 处理 4 h 后表达量上升直到 12 h,我们推测 *FtAPDSLX1* 在苦荞中参与抗立枯丝核菌病害。与此同时我们还在 *FtAPDSLX1* 的异源过表达转基因拟南芥材料中也证实了这一推测,将转基因植株以及野生型拟南芥通过 DAB 染色实验(图 9D)进行对比,发现 *FtAPDSLX1* 转基因植株的抗病性明显强于野生型拟南芥,因此推测天冬氨酸蛋白酶基因 *FtAPDSLX1* 在苦荞受到立枯丝核菌胁迫的情况下,其参与了苦荞的抗病防御机制。此外鉴于金荞对荞麦属病害的抗性强于苦荞,将 *FtAPDSLX1* 与金荞中的同源基因 *FD07G01375* 进行比对分析(图 4),也许由于空间结构上的差异,导致 *FD07G01375* 蛋白可能具有更强的蛋白活性,从而使金荞具有更强的抗病性。

对异源过表达 *FtAPDSLX1* 拟南芥的生理指标进行检测发现,在受到立枯丝核菌侵染时,过表达拟南芥株系的 POD 和 SOD 的活性发生了显著上升。POD 和 SOD 作为 ROS 清除相关的抗氧化酶,其活性的升高可降低自由基对细胞膜损伤,从而降低植株所受到的氧化损伤<sup>[27]</sup>。茉莉酸对 POD、SOD 等抗氧化酶活性具有上调作用,我们推测 *FtAPDSLX1* 可能参与 JA 途径提高了 POD、SOD 活性进而维持植物细胞蛋白稳态最终提高了苦荞对立枯丝核菌的抗性。研究证明,POD 和 SOD 活性可以显著影响大豆菌核病菌致病力<sup>[28]</sup>。在本实验研究结果中, *FtAPDSLX1* 可能通过影响 POD 和 SOD 活性降低苦荞遭受立枯丝核菌侵染时 ROS 积累,从而影响立枯丝核菌致病性。MDA 为脂质过氧化损伤的终产物之一,其活性可以反映植物机体脂质过氧化速率和强度<sup>[29]</sup>。在针对植物的抗逆和抗病生理研究中,通过对 MDA 活性进行测定可以侧面反映植物细胞的膜受损程度以及相应环境下植物响应胁迫的能力强弱<sup>[30]</sup>。*FtAPDSLX1* 转基因拟南芥在受到病菌侵染后,其 MDA 活性的上升幅度显著低于野生型拟南芥,以此可以说明, *FtAPDSLX1* 过表达拟南芥相较于野生型拟南芥在受到立枯丝核菌侵染时受损程度更低。综上所述, *FtAPDSLX1* 过表达拟南芥在受到立枯丝核菌侵染时,植株通过上调 POD 和 SOD 活性,同时降低 MDA 活性以增强植株对立枯丝核菌的抗病性。

综上,本研究通过转录组分析、生物信息学分析、异源转化拟南芥等手段发掘并研究了 *FtAPDSLX1* 的功能,证明其在苦荞对立枯丝核菌的抗性中发挥着重要作用,为苦荞抗病种质的选育提供了理论基础,同时也为其他作物的分子生物育种的基因筛选提供了参考。

## 参考文献

- [1] Zhang K, He M, Fan Y, Zhao H, Gao B, Yang K, Li F L, Tang Y, Gao Q, Lin T, Muriel Q, Janovská D, Meglič V, Kwiatkowski J, Romanova O, Chungoo N, Suzuki T, Luthar Z, Germ M, Woo S H, Georgiev M I, Zhou, M. Resequencing of global Tartary buckwheat accessions reveals multiple domestication events and key loci associated with agronomic traits. *Genome Biology*, 2021, 22(1), 1-17
- [2] Joshi D C, Zhang K, Wang C, Chandora R, Khurshid M, Li J, He M, Georgiev M I, Zhou M. Strategic enhancement of genetic gain for nutraceutical development in buckwheat: A genomics-driven perspective. *Biotechnology Advances*. 2020, 3-4(39):107479.
- [3] Joshi D C, Chaudhari G V, Sood S, Kant L, Pattanayak A, Zhang K, Fan Y, Janovská D, Meglič V, Zhou M. Revisiting the versatile buckwheat: reinvigorating genetic gains through integrated breeding and genomics approach. *Planta*. 2019,250(3):783-801
- [4] 范昱, 丁梦琦, 张凯旋, 杨克理, 唐宇, 方涛, 周美亮. 荞麦种质资源概况. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(4): 813-828
- Fan Y, Ding M Q, Zhang K X, Yang K L, Tang Y, Fang W, Zhou M L. Overview of buckwheat germplasm resources. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(40): 813-828
- [5] Dong X, Tang Y, Ding M, Li W, Li J, Wu Y, Shao J, Zhou M. Germplasm resources of buckwheat in China and their forage value[J]. *Pratacultural Science*, 2017, 11(2): 378-388
- [6] 齐杨菊, 陈振江, 李振霞, 刘辉, 王莉花, 李春杰. 荞麦病害研究进展. *草业科学*, 2020, 37(1): 75-86
- Qi Y J, Chen Z J, Li Z X, Liu H, Wang L H, Li C J. Progress in research on the diseases of buckwheat. *Pratacultural Science*, 2020, 37(1): 75-86
- [7] Liu X, Zhou S, Chen S, Yi Z, Pan H, Yao R. Buckwheat Disease Recognition Based on Convolution Neural Network. *Applied Sciences*. 2022; 12(9):4795
- [8] 赵江林, 江兰, 钟灵允, 谭茂玲, 赵钢. 荞麦立枯病原菌的分离与鉴定. *中国植物病理学会, 2018 年学术年会论文集*.北京:中国植物病理学会, 2018: 33
- Zhao J L, Jiang L, Zhong L Y, Tan M L, Zhao G. Isolation and identification of pathogenic bacteria from buckwheat blight. *Proceedings of 2018 annual conference of chinese society of plant pathology*. Beijing:Chinese Society of Plant Pathology, 2018: 33
- [9] 李光胜, 卢翔, 刘洋, 张凯旋, 王海华, 唐新科, 周美亮. 苦荞 FtEIN3 基因的克隆及其抗立枯病功能分析. *植物遗传资源学报*. 2023, 24(5): 1389-1400
- Li G S, Lu X, Liu Y, Zhang K X, Wang H H, Tang X K, Zhou M L. Cloning and Functional Analysis of the FtEIN3 Gene in Tartary Buckwheat Against Bacterial Blight. *Journal of Plant Genetic Resources*. 2023, 24(5): 1389-1400
- [10] E. C. Алексеева, 李淼, 卢瑞芳. 提高荞麦的抗病性. *国外农学-杂粮作物*, 1992(5): 46-49
- E. C. Алексеева, Li M, Lu R. Enhance the disease resistance of buckwheat. *Foreign agriculture - minor cereal crops*, 1992(5): 46-49
- [11] Alexander RD, Wendelboe-Nelson C, Morris PC. The barley transcription factor *HvMYB1* is a positive regulator of drought tolerance. *Plant Physiol Biochem*. 2019, 9(142): 246-253
- [12] Saavedra GM, Sanfuentes E, Figueroa PM, Figueroa CR. Independent Preharvest Applications of Methyl Jasmonate and Chitosan Elicit Differential Upregulation of Defense-Related Genes with Reduced Incidence of Gray Mold Decay during Postharvest Storage of *Fragaria chiloensis* Fruit. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(7):1420
- [13] Qi G, Chen J, Chang M, Chen H, Hall K, Korin J, Liu F, Wang D, Fu ZQ. Pandemonium Breaks Out: Disruption of Salicylic Acid-Mediated Defense by Plant Pathogens. *Molecular Plant*, 2018, 11 (12) : 1427-1439
- [14] MALAMY J, CARR J P, KLESSIG D F, et al. Salicylic Acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 1990, 250 (4983) : 1002-1004
- [15] He Y, Zhang K, Li S, et al. Multiomics analysis reveals the molecular mechanisms underlying virulence in *Rhizoctonia* and jasmonic acid-mediated resistance in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Plant Cell*. 2023 08 (35) :2773-2798
- [16] Zhang Z, Jiang C, Chen C, Su K, Lin H, Zhao Y, Guo Y. VvWRKY5 enhances white rot resistance in grape by promoting the jasmonic acid pathway. *Horticulture Research*. 2023, 10(10):uhad172
- [17] Yi-He Yu, Ze-Ling Jiao, Lu Bian, Yu-Tong Wan, Ke-Ke Yu, Guo-Hai Zhang, Da-Long Guo. Overexpression of *Vitis vinifera* VvZIP60 enhances Arabidopsis Thaliana resistance to powdery mildew via the salicylic acid signaling pathway. *Scientia Horticulturae*. 2019, 10(256):108640
- [18] HUNJAN M S, KUMAR S, LORE J S, et al. Efficiency of different *Rhizoctonia solani* inoculum source against sheath blight screening in rice under field conditions [J]. *Tropical Plant Pathology*, 2022, 47(2): 309-313
- [19] KOTBA I, ACHOURI M, BENBOUAZZA A, et al. Morphological, Pathogenic and Molecular Characterisation of *Rhizoctonia solani* Strains Isolated from Potato. *Sciencedomain International*, 2018, 11(4):1-16

- [20] 徐琴琴, 陈卫良, 毛碧增. 立枯丝核菌毒素的研究进展. 核农学报, 2020, 34(10): 2219-2225  
Xu Q Q, Chen W L, Mao B Z. Research Progresses in Phytotoxin Produced by *Rhizoctonia solani*. Journal of Nuclear Agriculture, 2020,34 (10): 2219-2225
- [21] Rodrigo I, Vera P, Conejero V. Degradation of tomato pathogenesis-related proteins by an endogenous 370kDa aspartyl endoproteinase. European Journal of Biochemistry, 1989, 184(3), 663-669
- [22] Rodrigo I, Vera P, Van Loon L C, Conejero V. Degradation of tobacco pathogenesis-related proteins: evidence for conserved mechanisms of degradation of pathogenesis-related proteins in plants. Plant physiology, 1991, 95(2): 616-622
- [23] Xia Y J, Suzuki H, Borevitz J, Blount J, Guo Z J, Patel K, Dixon R A, Lamb C. An extracellular aspartic protease functions in Arabidopsis Thaliana disease resistance signaling. The EMBO journal, 2014, 23(4): 980-988
- [24] Qiu D, Xiao J, Ding X, Xiong M, Cai M, Cao Y, Li X, Xu C, Wang S. OsWRKY13 Mediates Rice Disease Resistance by Regulating Defense-Related Genes in Salicylate- and Jasmonate-Dependent Signaling. Molecular plant-microbe interactions 2007,20(5):492-499
- [25] Yang Z, Huang Y, Yang J, Yao S, Zhao K, Wang D, Qin Q, Bian Z, Li Y, Lan Y, Zhou T, Wang H, Liu C, Wang W, Qi Y, Xu Z, Li Y. Jasmonate Signaling Enhances RNA Silencing and Antiviral Defense in Rice. Cell Host & Microbe. 2020,28(1):89-103
- [26] Ma W, Pang Z, Huang X, Xu J, Pandey SS, Li J, Achor D S, Vasconcelos FNC, Hendrich C, Huang Y, Wang W, Lee D, Stanton D, Wang N. Citrus Huanglongbing is a pathogen-triggered immune disease that can be mitigated with antioxidants and gibberellin. Nature Communications . 2022,1(13): 1 – 13
- [27] 刘银萍. '洛阳红'花期花瓣抗氧化酶 SOD, POD 和 CAT 活性的研究. 河南林业科技, 2020, 40(03):13-15, 41  
Liu Y P. The Study of Antioxidants of 'Luoyanghong' on Petals about SOD、POD、CAT During Florescences. Henan Forestry Science and Technology. 2020, 40(03):13-15, 41
- [28] 李易初, 石凤梅, 马立功, 刘佳孟, 庆林. 核盘菌菌丝内 POD 和 SOD 活性与其对大豆致病力关系初探. 黑龙江八一农垦大学学报, 2021,33(1):1-6, 14  
Li Y C, Shi F M, Ma L G, Liu J M, Qing L. The relationship between SOD and POD activities of nuclear and its pathogenicity to soybean. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University, 2021,33(1):1-6, 14
- [29] Pilarska M, Skowron E, Pietraś R, Krupinska K, Niewiadomska E. Changes in lipid peroxidation in stay-green leaves of tobacco with senescence-induced synthesis of cytokinins. Plant Physiology and Biochemistry, 2017,9(118):161-167
- [30] Li J, Feng L, Li D, Liu X L, Pan Y Y, He J, Zhang J X. ROS Regulate NCF2, Key Metabolic Enzymes and MDA Levels to Affect the Growth of *Fusarium solani*. Agriculture, 2022, 12(11): 1840.